

THESIS

München
MÜNICH

1968

**Elektronenmikroskopische
Untersuchungen der Phagozytose
und Wirkung pyrogener Reizstoffe
im Knochenmark**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

CHRISTOPH STEIDLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER PHAGOZyTOSE UND
WIRKUNG PYROGENER REIZSTOFFE IM KNOCHENMARK

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung
der
Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Christoph Steidle
aus
München
1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. STICH

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. H. SCHWIEGK

Dekan:

Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung:

7. 5. 1968

EINLEITUNG

Die Feinstruktur des Knochenmarks als eines an der Blutbildung beteiligten Organs sowie seines Gefäßsystems wurde mehrfach untersucht (PEASE, 1956, ZAMBONI u. Mitarb. 1961, WEISS 1965, HUHNS 1966). Das Knochenmark als Bestandteil des retikulo-histiozytären Systems (RHS) wurde hierbei wenig berücksichtigt. Um von den feinstrukturellen Befunden Rückschlüsse auf die Funktion der Knochenmarkszellen ziehen und diese Zellen somit genauer differenzieren zu können, erschien es daher lohnend, das Mark während der verschiedenen Phasen der Aufnahme einer intravenös zugeführten, elektronenoptisch sichtbaren Substanz zu untersuchen.

Als derartige "Tracer"-Substanzen fanden kolloidale (MAJNO u. Mitarb. 1961 a, PALADE 1961 u. a.) oder großmolekulare (FARQUHAR u. Mitarb. 1961) Metallverbindungen sowie die Kohlepartikel einer standardisierten Tusche (MAJNO u. Mitarb. 1961 b, MOVAT u. Mitarb. 1963) Verwendung. Wegen der verschiedenen, den Metall-Tracern anhaftenden, später zu erörternden Nachteile, wählten wir für unsere Versuche Kohlepartikel als Tracer-Substanz.

Die morphologischen Vorgänge im feinstrukturellen Bereich bei der Passage eines Tracers durch die Gefäßwand wurden bisher vorwiegend an den Gefäßen des lockeren Bindegewebes unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (ALKSNE 1959, PALADE 1960, 1961; MAJNO u. Mitarb. 1961, MOVAT u. Mitarb. 1963, COTRAM 1965) sowie an Niere (FARQUHAR u. Mitarb. 1961) und Leber (HAMPTON 1958, FILKINS u. Mitarb. 1965) untersucht. Sie waren daher noch an den Gefäßen des Knochenmarks mit ihren zahlreichen Besonderheiten darzustellen.

Die Kinetik der Aufnahme intravenös injizierter Partikel durch das RHS läßt sich anhand der Geschwindigkeit ihres Verschwindens aus dem Blutstrom bestimmen; diese Clearance wurde für radioaktiv markierte Substanzen (BENACERRAF u. Mitarb. 1957, NORMANN 1957) und Tusche (BIOZZI u. Mitarb. 1953) - auch unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (BENACERRAF u. Mitarb. 1959, FILKINS u. Mitarb. 1965, FRIDRICH 1965, 1966; KEENE u. Mitarb. 1965, KAMPSCHMIDT u. Mitarb. 1965, NORMANN u. Mitarb. 1965 a, b; WIENER u. Mitarb. 1967) - untersucht. Die morphologischen Verhältnisse sowie die Kinetik der Verteilung des Tracers innerhalb des RHS nach seinem Verschwinden aus dem Blutstrom lassen sich mit diesen Methoden aber nicht aufklären. Wir haben uns daher bemüht, durch Auszählen der phagozytierten Kohlepartikel in-

nerhalb des Knochenmarks während eines längeren Zeitraums nach der intravenösen Injektion die zeitlichen Abläufe festzuhalten.

Es ist bekannt, daß durch bakterielle Reizstoffe eine Leukozytose verursacht (HEILMEYER 1957, BIRO u. Mitarb. 1960, ERHARDT u. Mitarb. 1962, FRICK u. Mitarb. 1964), die Phagozytoseaktivität und der Enzymgehalt der Granulozyten beeinflußt (BERGMANN u. Mitarb. 1954, MERKER 1961) und die Tusche'-clearance gesteigert (KAMPSCHMIDT u. Mitarb. 1965) werden kann. Der Angriffspunkt der bakteriellen Reizstoffe ist umstritten; u. a. wird ein unspezifischer, einer Röntgenbestrahlung vergleichbarer Knochenmarkkreis diskutiert (STODTMEISTER u. Mitarb. 1957). Die feinstrukturellen Veränderungen des Knochenmarks nach Pyrexal^R-Injektion sowie evtl. morphologische oder kinetische Veränderungen der Tusche'phagozytose durch Pyrexal^R sollten daher schließlich kontrolliert werden.

MATERIAL UND METHODE

1) Versuchstiere:

35 männliche Sprague-Dawley-Ratten, Gewicht 200-250 g. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrollratte ohne Injektion von Tusche oder Pyrexal und sonst wie die übrigen Tiere behandelt mitgeführt.

2) Präparation für elektronenmikroskopische Untersuchung:

In Äthernarkose vorsichtige Freipräparation eines Femur-Knochens, Aufspaltung des Knochens und vorsichtiges Herauslösen des Marks unter Frierlösung, Fixation in Glutaraldehydlösung (SAVATINI u. Mitarb. 1963), Nachfixierung in OsO_4 -Lösung, Entwässerung, Einbettung in Maraglas (SPURLOCK u. Mitarb. 1963) Nachkontrastierung der Schnitte in Uranylazetat-Blei (REYNOLDS 1963) und Untersuchung im Elektronenmikroskop Elmiskop IA (Siemens). Ausführliche Beschreibung der Präparation bei HUHN (1966).

3) Tracer:

Rußdispersion C 11/1431 A der Firma G. Wagner GmbH Hannover; enthält (nach Angaben der Firma): 10% Gasruß (Teilchengröße 200-300 Å), 4,3% Fischleim (trocken), 1% Karbolsäure, Rest Wasser. Die Tusche wurde in einer Dosierung von 0,1 ml pro 100 g Körpergewicht mit einer Tuberkulinspritze in eine Schwanzvene injiziert.

4) Pyrogener Wirkstoff:

Pyrexal^R (Firma Dr. A. Wander GmbH, Frankfurt). Enthält kein Protein und wird aus Coli-Bakterien gewonnen. Die Versuchsdosis wurde so gewählt, daß bei geringem Temperaturanstieg (rektal gemessen) ein deutlicher Leukozytenanstieg provoziert wurde (WEINREICH u. MITARB. 1960). Hierfür waren, in physiologischer NaCl-Lösung, 0,004 bis 0,006 Gamma pro 100 g Körpergewicht erforderlich, unter sterilen Bedingungen in eine Schwanzvene injiziert.

5) Erste Versuchsreihe (Tusche-Injektion):

Tötung der Ratten 5, 10, 15, 60 und 300 Minuten sowie 1, 4, 14, 28 und 56

Tage nach Tuscheinjektion. Jeweils Kontrollen ohne Injektion.

6) Zweite Versuchsreihe (Pyrexal- und Tuscheinjektion):

Tötung der Ratten (14 Versuchstiere, 6 Kontrolltiere) 15, 60, 120 und 180 Minuten nach Pyrexalinjektion; 5 Minuten vor der Tötung (in einem Versuch 60 Minuten vor der Tötung, gleichzeitig mit der Pyrexalinjektion) Injektion von Tusche.

Bestimmung der absoluten Granulozytenzahlen (aus Leukozytenzahl und Differentialblutbild, jeweils von zwei Personen zweimal ausgezählt) aus Blutentnahmen aus der Schwanzvene zu folgenden Zeitpunkten: Vor Pyrexalinjektion; 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Pyrexalinjektion. Als Kontrolle wurde Ratten eine der Pyrexal-Injektion entsprechende Volumenmenge an physiologischer NaCl-Lösung injiziert.

7) Kinetik der Tuschephagozytose:

Um eine halbquantitative Aussage über den zeitlichen Ablauf der Tusche-phagozytose zu ermöglichen, wurden die im Elektronenmikroskop sichtbaren Tuschepartikel ausgezählt. Hierfür wurden erstens die Tuschepartikel entsprechend ihrer Ablagerungsart eingeteilt in:

- a) "Einzelpartikel" und Konglomerate von Einzelpartikeln
- b) "Zytosomen", d.h. Partikel in membranumschlossenen Körpern (Zytosomen), evtl. in Verbindung mit anderem Material.

Weiterhin wurde entsprechend dem Ablagerungsort eingeteilt in:

- a) Abgelagerte Tusche im Gefäßlumen (frei im Lumen, von Lymphozyten phagozytiert oder frei an das Endothel angelagert);
- b) mit Beziehung zum Endothel (zwischen zwei Endothelzellen, in einer Membraneinstülpung der Endothelzelle, intrazellulär);
- c) extrazellulär im Parenchym;
- d) intrazellulär im Parenchym (phagozytiert von Retikulumzellen oder anderen Zellen).

Bei diesen Untersuchungen wurden etwa 300 Sinus-, 30 Kapillar-, 12 Arteriolenanschnitte mit dem umgebenden Parenchym auf Kohlepartikel überprüft.

ERGEBNISSE

I. Morphologische Befunde

Die Feinstruktur von Gefäßsystem und phagozytierenden Retikulumzellen des Knochenmarks ist aus früheren Untersuchungen bekannt und soll hier nicht erneut beschrieben werden. Die injizierten Tuscheartikel liegen zunächst einzeln, lose aggregiert (Abb. 1) oder in dichteren Aggregaten (Abb. 2) in den Lumina der angeschnittenen Gefäße. Ein einziges Mal fand sich auch ein mit Tuschepartikeln versetztes Thrombozytenkonglomerat, angelagert an die Wand eines Zentralsinus. Innerhalb der zahlreichen von uns untersuchten Gefäße erfolgte eine Tuscheaufnahme nur im Bereich der Sinus. Den morphologischen Befunden nach zu urteilen, können zwei Arten der Tuscheaufnahme durch die Sinuswand unterschieden werden:

1) Tuscheartikel liegen an die Sinuswand angelagert oder vor einem der im Sinusbereich zahlreichen pinozytotischen Bläschen (Abb. 1); im nächsten Stadium liegen die Partikel innerhalb der Sinusendothelzelle in einem zum Gefäßlumen noch offenen Bläschen (Abb. 2 unten); schließlich finden sich die Tuscheiteilchen, allseits von Membran umgeben, innerhalb der Sinusendothelzelle (Abb. 3).

2) Die Sinusendothelzelle bildet fingerartige Fortsätze, mit denen sie die Tuscheartikel zu umfassen und innerhalb eines so gebildeten Bläschens aufzunehmen scheint (Abb. 2, oben). Innerhalb der Endothelzelle werden die Partikel zunächst einzeln oder zu mehreren eingelagert, im allgemeinen von einer Membran eingeschlossen. Etwas später werden sie innerhalb größerer, membranumgebener Körper, sogenannter Zytosomen, intrazellulär abgelagert. Grundsätzlich sind zwei Arten von Zytosomen zu trennen:

- a) Zytosomen, in denen mehr oder weniger Tuscheartikel innerhalb eines dichten, feingranulären Materials vorhanden sind (Abb. 4).
- b) Zytosomen, in denen nur Tuscheartikel innerhalb eines elektronenoptisch fast leer erscheinenden Mediums abgelagert sind. (Abb. 5)

Zwischen diesen Zytosomen gibt es fließende Übergänge (Abb. 6). Tuschehaltige Zytosomen mit feingranulärem Material überwiegen in den früheren Stadien der Tuscheaufnahme (bis 14 Tage, Abb. 7) sowie besonders innerhalb der Tu-

sche-phagozytierenden Retikulumzellen (Abb. 8, 9), wo oft das feingranuläre Material die Tuscheartikel an Menge weit übertreffen kann. Die Zytosomen, die Tuscheartikel innerhalb eines leer erscheinenden Mediums enthalten, überwiegen in den Sinuswänden in den späteren Phasen der Kohlephagozytose (nach mehreren Wochen, Abb. 10 und 11).

Gelegentlich finden sich tuschehaltige Zytosomen innerhalb ins Parenchym ragender Zytoplasmafortsätze der Sinusendothelzellen (Abb. 7). Derartige Fortsätze scheinen gelegentlich von phagozytierenden Retikulumzellen eng umschlossen zu werden.

II. Kinetik der Tuschephagozytose

Die Kinetik der Tuscheaufnahme ist in Abb. 11 schematisch dargestellt worden. Die absolute Anzahl der ausgezählten Partikel und Zytosomen (Zahlen über den Säulen der Abb. 11) besitzt keine Aussagekraft; sie hängt zu sehr von inkonstanten Faktoren ab - wie Zahl der untersuchten Gefäßanschnitte, Schnittdicke, Tuscheverteilung innerhalb verschiedener Markabschnitte, Größe der Tuschekonglomerate und Zytosomen usw. - Es wurden daher alle zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Tuscheinjektion auf ihrem Weg vom Gefäßlumen zur phagozytierenden Zelle ausgezählten Partikel (bzw. Zytosomen) addiert und ihre Summe als 100% angenommen. Die Zahl des jeweiligen Partikel in den verschiedenen Stadien der Phagozytose (Gefäßlumen - Endothelzelle - Markparenchym) konnten dann in Prozent dieser gesamten Partikel angegeben werden (Prozentzahlen über den Säulen der Abb. 11).

5-15 Minuten nach Tuscheinjektion (vergleiche jeweils die vereinfachte Darstellung in Abb. 12) befand sich der größte Teil der Tuscheartikel (68%) im Lumen der Sinus oder anderer Gefäße, zum Teil frei an das Endothel angelagert. Zahlreiche Tuscheartikel (28%) waren bereits von den Sinusendothelzellen aufgenommen worden; sie lagen vorwiegend als membranumgebene einzelne Partikel innerhalb der Zellen, zu einem kleineren Teil auch bereits zu Zytosomen zusammengefaßt. Tuschehaltige Zytosomen fanden sich zu diesem Zeitpunkt ausschließlich (100%) in den Sinusendothelzellen.

Ganz vereinzelte Tuscheartikel waren innerhalb der Gefäßlumina von Lymphozyten phagozytiert worden (wegen der geringen Anzahl in Abb. 11 nicht aufgeführt). Wenige Tuscheartikel (4%) lagen frei extrazellulär, also nicht von Zel-

len phagozytiert, innerhalb des Markparenchyms,

1-1 Stunden nach Tuscheinjektion war keine Tusche mehr extrazellulär in Gefäßlumina und Markparenchym nachzuweisen; es befanden sich also alle Tuscheteilchen intrazellulär, phagozytiert. Die Tusche lag jetzt nicht mehr in Form von Einzelpartikeln vor, sondern nur noch innerhalb von Zytosomen; diese Zellorganellen lagen zum Großteil in den Sinusendothelzellen (94%), vereinzelt in phagozytierenden Retikulumzellen (6%), Tuschepartikel in Kinetulpongen (pinocytotischen Bläschen) der zum Parenchym gerichteten Zellmembran der Sinusendothelzellen, an diese frei angelagert oder in Verbindung mit einem Basalmembran-ähnlichen Material ließen sich in keiner Phase der Versuche jemals nachweisen. Ganz vereinzelt Tuscheteilchen fanden sich in Lymphozyten, Myelozyten und Granulozyten innerhalb des Parenchyms (in Abb. 12 nicht aufgeführt).

1-4 Tage nach Injektion fanden wir den Anteil von tuschehaltigen Zytosomen innerhalb der phagozytierenden Retikulumzellen vermehrt (18%).

4-8 Wochen nach Tuscheinjektion fanden sich in gleicher Anzahl tuschehaltige Zytosomen in Sinusendothelzellen und phagozytierenden Retikulumzellen (jeweils 50%). Diese Zytosomen waren jetzt im allgemeinen sehr groß, diejenigen in den Retikulumzellen enthielten viel zusätzliches feingranuläres Material, die Zytosome in den Sinusendothelzellen wenig.

III. Pyrexal-Versuche

Nach Pyrexalinjektion diente uns der Ausstieg der Granulozyten (Abb. 18) als Parameter der Pyrexalwirkung. Elektronenoptisch ließ sich keine erhöhte Granulozytenanschwemmung vom Markparenchym in die Linsen feststellen. Desgleichen konnten keine morphologischen Veränderungen an den Gefäßen festgestellt werden. Anhand der Tuscheinjektionen konnte keine stärkere Durchlässigkeit der Sinuswände gegenüber den Tuscheartikeln festgestellt werden. Die Kinetik der Tuscheaufnahme durch das Sinusendothel zeigte keine verwertbaren Änderungen nach Pyrexalinjektion; insbesondere waren extrazellulär im Parenchym liegende Tuscheteilchen nach Pyrexalinjektion nicht vermehrt.

DISKUSSION

1) Die Phagozytosevorgänge nach Tuscheinjektion spielen sich im Knochenmark ausschließlich im Bereich der Sinus ab; die Feinstruktur der Sinus ist daher für das Verständnis der Phagozytose-Untersuchungen von Interesse und soll kurz erörtert werden. Die Sinuswand wird von den dünnen ausgezogenen Fortsätzen der Sinusendothelzellen gebildet. Die Sinuswand wird als einschichtig, also nur vom Fortsatz der Sinusendothelzelle gebildet, beschrieben (PEASE 1965, ZAMBONI u. Mitarb. 1961, HUHN 1966) oder als stellenweise ein-, stellenweise dreischichtig; "dreischichtig" durch eine "lining cell", die Basalmembran und eine "adventitial cell" (WEISS 1965). Lücken in der Sinuswand werden beschrieben (PEASE 1956, ZAMBONI u. Mitarb. 1961, WEISS 1965). Nach unseren früheren (HUHN 1966) und jetzigen Untersuchungen ist die Sinuswand als einschichtig aufzufassen. Eine besondere "Adventitia-Zelle" ließ sich nicht nachweisen. Ein feingranuläres, flockiges Material in Nachbarschaft der Sinusendothelzelle ist nur sehr lokalisiert und ebenso auch in der Nachbarschaft anderer Knochenmarkszellen anzutreffen; eine vermehrte Ablagerung von Kohlepartikeln an diesem fraglichen, Basalmembran-ähnlichen Material war ebenfalls nicht festzustellen. Zur Bezeichnung dieses nur selten anzutreffenden subendothelialen Materials als "Basalmembran" - im übrigen wohl mehr eine Nomenklaturfrage - konnten wir uns daher nicht entschliessen.

Lücken in der Sinuswand konnten wir in gut fixierten, mechanisch offensichtlich nicht beschädigten Bezirken nicht feststellen. Gegen ohne besonderen funktionellen Anlaß (Durchtritt von Blutzellen) bestehende Unterbrechungen der Sinuswand sprechen außerdem zwei Befunde:

- a) Intravenös injizierte Tuscheartikel sind im Gefäßlumen sowie intrazellulär in Sinusendothelzellen und Retikulumzellen nachzuweisen. Nur in ganz geringem Prozentsatz (4%) und während des Zeitraums von 5-10 min. p. i. sind Partikel extrazellulär im Parenchymraum anzutreffen; das Vorhandensein dieser 4% Tuscheartikel außerhalb der Gefäße läßt sich als Artefakt deuten: Zerreißung von Markgefäßen während der Präparation, Verschleppung durch das Messer beim Schneiden der kleineren Gewebeblöcke für die Osmium-Nachfixation, Verschleppen durch das Messer bei der Anfertigung der Dünnschnitte.
- b) Das Medium innerhalb der Sinus hat meistens eine andere, stärker feinflockig-granuläre Konsistenz als das außerhalb der Sinus (Abb. 10).

Die von anderen Untersuchern beschriebenen Lücken der Sinuswand könnten durch unterschiedliche Präparationsmethoden (Erstfixierung in OsO_4) bzw. die gefäßaktive Wirkung des als Tracer verwendeten Thorotrastes (ZAMBONI u. Mitarb. 1961) zu erklären sein.

2) Die Feinstruktur der phagozytierenden Retikulumzellen ist durch ihr ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, die zahlreichen Reste phagozytierter Erythrozyten und ihre unregelmäßige, weitverzweigte äußere Form charakterisiert. Sie sind nach ihren morphologischen Kriterien deutlich von ins Parenchym ragenden Fortsätzen der Sinusendothelzellen zu unterscheiden. Eine Verwechslung von tangential angeschnittenen Sinusendothelzellen mit phagozytierenden Retikulumzellen als Fehlerquelle beim Auszählen der phagozytierten Tuschepartikel ist daher nicht anzunehmen.

3) Eine quantitative Auszählung von Partikeln ist aus vielen Gründen sehr problematisch; Die Zahl der untersuchten Schnitte ist, obwohl sie mehrere hundert beträgt, für exakte quantitative Aussagen zu gering; Schnittdicke, Auswahl der untersuchten Markregion, Auswahl des jeweils im Dünnschnitt erfaßten kleinen Bezirks sind unterschiedlich; die Menge der Tuschepartikel innerhalb größerer Tuschekonglomerate oder Zytosomen konnte nicht berücksichtigt werden. Die absoluten Zahlen der ausgezählten Partikel und Zytosomen haben daher keine große Aussagekraft. Die Prozentzahlen der Tuscheablagerungen während der jeweiligen Versuchsperiode innerhalb der verschiedenen Markbezirke können aber doch einen guten Einblick in die Verteilung der Tusche im Mark zu verschiedenen Zeiten vermitteln und damit den zeitlichen Ablauf der Tuschephagozytose aufhellen.

4) Die Untersuchung von Zellfunktionen im Rahmen morphologischer Studien mittels eines Tracers beinhaltet grundsätzlich das Problem, daß durch die Injektion dieses Stoffes bereits unphysiologische Verhältnisse geschaffen werden. So konnten wir in einem Fall, 10 Minuten nach Tuscheinjektion, ein an die (Zentral-) Sinuswand angelagertes, mit Tusche vermisches Thrombozytenagglomerat beobachten. Andere feinstrukturelle Veränderungen ließen sich bei den Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren nicht feststellen. Auch andere Untersuchungen beschrieben keine wesentlichen feinstrukturellen oder funktionellen Veränderungen durch i. v. -injizierte Tusche in der von uns angewandten Zusam-

mensetzung und Menge (MOVAT u. Mitarb. 1963). Bei großmolekularen oder kolloidalen Schwermetallverbindungen als Tracer ist eine pharmakologische Wirkung durch Komplexbildung mit Eiweißkörpern, durch Fermenthemmung und Kapillarschädigung nicht auszuschließen (MUIR u. Mitarb. 1961, DE BAKER u. Mitarb. 1961, KUSCHINSKY 1966); bei Verwendung von Thorotrast ist die gefäßaktive Wirkung von Dextrin neben der ionisierenden Strahlung des Thoriums zu berücksichtigen (ROWLEY 1963), Schließlich konnte nachgewiesen werden, daß Thorotrastpartikel und Ferritin - sogar nach OsO_4 -Fixierung in vitro - passiv Zellmembranen durchdringen können (KAYE u. Mitarb. 1962a, b; TORMEY 1965).

5) In ihrem Verhalten nach i. v. -Tuscheinjektion unterscheiden sich die Knochenmark-Sinus von anderen untersuchten Gefäßbezirken: Die Endothelien von Kapillaren phagozytieren -auch nach experimentell gesetztem Entzündungsreiz (MAJNO u. Mitarb. 1961 a, b; MOVAT u. Mitarb. 1963) - praktisch keine Kohlepartikel. Bei den von uns injizierten Tuschemengen wird weitaus der größte Teil durch die Leber phagozytiert (BIOZZI u. Mitarb. 1953). So sind die in den Kupfferschen Sternzellen gebildeten, tuschehaltigen Zytosomen unvergleichlich viel größer als die in den Sinusendothelien des Knochenmarks (WIENER u. Mitarb. 1967) und mehr auf den eigentlichen Zelleib in Kernnähe beschränkt. Im Knochenmark findet die Phagozytose gleichmäßig im ganzen Verlauf der Sinusendothelzellen, also auch im Bereich der dünnen Zellfortsätze statt. Hier sind tuschehaltige Zytosomen sogar noch nach 8 Wochen in gleicher Häufigkeit wie innerhalb phagozytischer Retikulumzellen festzustellen (Abb. 11).

Die Bedeutung des in verschiedenem Ausmaß in den tuschehaltigen Zytosomen enthaltenen feingranulären Materials ist unklar. Dieses Material ist bereits in den kleinsten, zu Beginn der Phagozytose entstandenen Vesikeln zu erkennen (Abb. 3); möglicherweise handelt es sich daher um die in der injizierten Tusche mitenthaltene Gelatine. Es ist bekannt, daß der Gelatinegehalt der Tusche einen Einfluß ausübt auf die Geschwindigkeit, mit der injizierte Tusche-
teilchen durch Phagozytose an dem zirkulierenden Blut entfernt werden (NORMANN u. Mitarb. 1965 a, b).

Der Mechanismus der Übertragung der Tuscheartikel von den Sinusendothelzellen auf die phagozytierenden Retikulumzellen konnte nicht ganz aufgeklärt werden. Daß einzelne Partikel vom Endothel angegeben und von den Retikulumzellen aufgenommen werden, ist auszuschließen: Freie, extrazelluläre Kohlepar-

tikel konnten später als 15 Minuten nach Injektion nicht im Parenchym festgestellt werden. Auch eine Anlagerung von Retikulumzellen an die Sinusendothelzellen zur evtl. Übernahme der Tusche wurde nicht beobachtet. Es bleiben also vor allem zwei Möglichkeiten zu diskutieren:

- a) Ein Herauslösen einzelner, tuschebeladener Sinusendothelzellen aus dem Endothelverband und Umwandlung in phagozytierende Retikulumzellen (vergl. Abb. 7).
 - b) Phagozytose einzelner zugrundegegangener Endothelzellen durch phagozytierende Retikulumzellen; auch für diese zweite Möglichkeit liessen sich morphologische Hinweise finden.
- 6) Die photometrische Bestimmung der Geschwindigkeit, mit welcher i. v. - injizierte Kohlepartikel aus dem Serum verschwinden (= "Kohle-Clearance") hat Bedeutung für die Untersuchung der Aktivität des RES erlangt. Es wird vermutet, daß die Kohle-Clearance von einem Serum - (NORMANN u. Mitarb. 1965 b) oder Plasma- (FILKINS u. Mitarb. 1965) Faktor beeinflusst wird; desgleichen wird die Kohle-Clearance verändert durch hohe Dosen ionisierender Strahlen (BENACERRAF u. Mitarb. 1959), durch Corticoide (WIENER u. Mitarb. 1967), Chlorambucil (MEGIRIAN 1965) und Endotoxin (KAMPSCHMIDT u. Mitarb. 1965). Mit dem Coli-Bakterien gewonnenen Reizstoff "Pyrexal" läßt sich eine Leukozytose im peripheren Blut provozieren (HEILMEYER 1957, BIRO u. Mitarb. 1960), die Phagozytoseaktivität der Granulozyten steigern (BERGMANN u. Mitarb. 1954) und ihre Aktivität an alkalischer Phosphatase vermindern (MERKER 1961). Als Mechanismus der Wirkung entsprechender Reizstoffe wird ein über der Hypophysen-Nebennierenrinden-System wirkender unspezifischer Reiz diskutiert, der zu einer Weiterstellung der Mark-Sinus und Zellausschwemmung führt (STODTMEISTER u. Mitarb. 1957). Wir konnten nach Pyrexal-Injektion zwar einen deutlichen Anstieg der peripheren Leukozytenzahlen feststellen; morphologische Veränderungen am Mark oder deutliche Änderungen der morphologischen oder kinetischen Vorgänge bei der Tusche-phagozytose waren aber nicht nachzuweisen. Auch ließen sich keine vermehrten Leukozyten während der Durchschleusung durch die Sinuswände finden, was für den relativ schnellen Ablauf dieses Vorgangs sprechen könnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die feinstrukturellen Vorgänge bei Phagozytose intravenös injizierter Tusche im Knochenmark der Ratte werden beschrieben:

5-15 Minuten nach Injektion werden einzelne Kohlepartikel mittels pinozytischer Membraneinstülpungen oder fingerförmiger Ausstülpungen von den Sinusendothelzellen aufgenommen und in kleinen, membranumgebenen Vesikeln abgelagert, die sodann zu größeren Zytosomen konfluieren. Die Zytosomen enthalten - neben dem phagozytierten Kohleteilchen - mehr oder weniger feingranuläres Material. Von den Sinusendothelzellen gelangt die aufgenommene Tusche in die charakteristischen phagozytierenden Retikulumzellen, wo sie zusammen mit großen Mengen feingranulären Materials in Zytosomen abgelagert wird. Freie, extrazelluläre Tusche wird im Markparenchym nur ganz vereinzelt und nur während der ersten 5-15 min. p. i. gefunden. Es wird diskutiert, daß die frei im Parenchym angetroffenen Partikel artefiziell dorthin verschleppt wurden. Mittels Auszählung von Tuschepartikeln wurden die zeitlichen Abläufe festgehalten: 5-15 Minuten nach Injektion befinden sich einzelne Tuschepartikel im Lumen der Gefäße und in den Sinusendothelzellen; viel Tusche ist aber auch schon in Form von Zytosomen in den Sinusendothelzellen abgelagert. Eine Stunde bis 14 Tage nach Injektion ist Tusche nur noch innerhalb von Zytosomen abgelagert; zum großen Teil in den Sinusendothelzellen, zum kleineren Teil in phagozytierenden Retikulumzellen.

4-8 Wochen nach Injektion sind kohlehaltige Zytosomen in Endothel- und phagozytierenden Retikulumzellen gleich häufig. Injektion von Pyrexal verursachte eine periphere Leukozytose, rief aber im Knochenmark keine deutlichen Veränderungen in Struktur oder Tuscheverteilung hervor.

Die Problematik von Tracer-Untersuchungen im feinstrukturellen Bereich und ihrer quantitativen Auswertung wird diskutiert; die Folgerungen, die sich aus den Ergebnissen für das Verständnis von Feinstruktur und Funktion des Knochenmarks als eines Bestandteils des RHS ziehen lassen, werden besprochen.

LEGENDEN ZU DEN ABBILDUNGEN:

E	≈	Erythrozyt
EB	≈	Erythroblast
L	≈	Sinusbogen
M	≈	Mitochondrien
N	≈	Zellkern
Pv	≈	Pinozytotisches Bläschen
SE	≈	Sinusendothelzellen
T	≈	Tuschepartikel
Z	≈	Zytosom

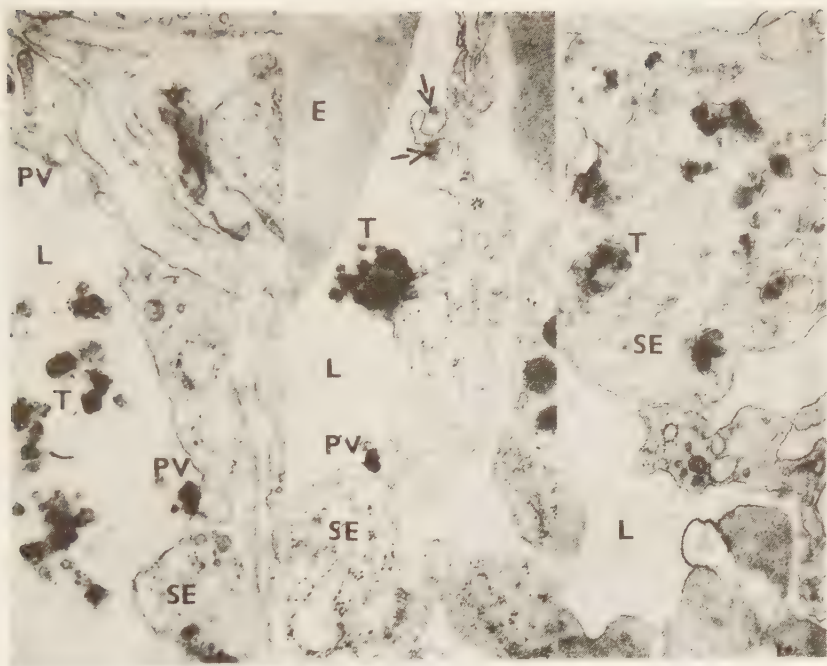


Abb. 1: 36 000 x vergr. 5 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen mit einzelnen Kohlepartikeln; diagonal Sinusendothelzelle mit 2 pinozytotischen Bläschen, vor dem unteren ein Kohlepartikel.

Abb. 2: 30 000 x vergr. 5 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen mit 3 einzelnen Kohlepartikeln und einem Konglomerat von Partikeln. Unten Kohleteilchen innerhalb eines - zum Gefäßlumen noch offenen - pinozytotischen Bläschens. Oben (Pfeile) werden zwei Einbuchtungen der Zelloberfläche durch fingerförmige Ausstülpungen gebildet.

Abb. 3: 28 000 x vergr. 5 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen. Sinusendothelzelle leicht tangential getroffen: mit zahlreichen, von Membranen eingeschlossenen Tuscheteilchen. Die tuschehaltigen Vesikel dürften z.T. in anderer Bildebene mit dem Sinuslumen in Verbindung stehen.

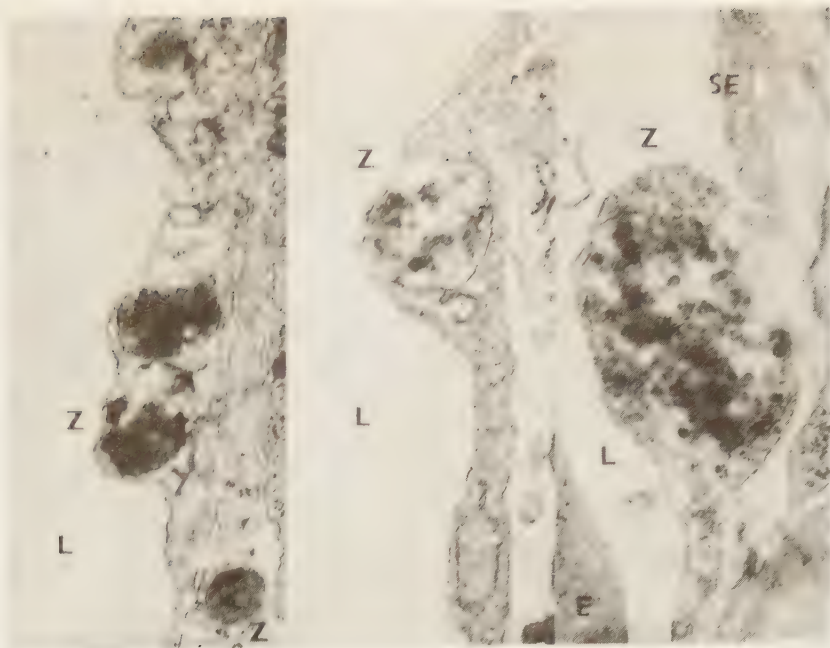


Abb. 4: 29 400 x vergr. 60 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen, Zytosomen, die Tusche und feingranuläres Material enthalten.

Abb. 5: 32 200 x vergr. 60 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen, Sinusendothelzelle mit tuschehaltigem Zytosom, wenig feingranuläres Material.

Abb. 6: 33 000 x vergr. 60 Minuten nach Tuscheinjektion. Links Sinuslumen, Zwei aneinandergrenzende Fortsätze von Sinusendothelzellen; der untere mit großem tuschehaltigem Zytosom.

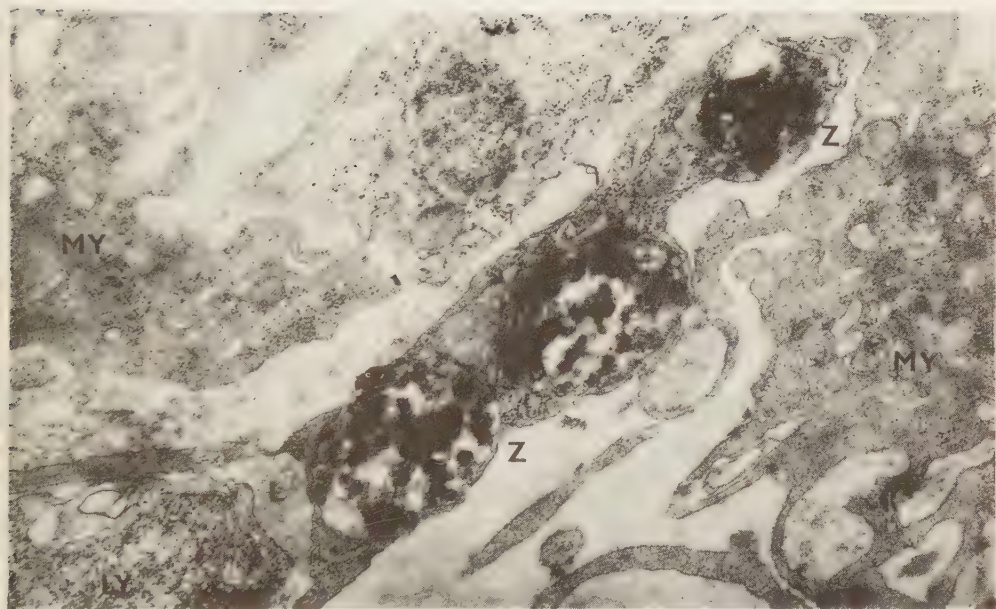


Abb. 7: 36 400 x vergr. 14 Tage nach Tuscheinjektion. Links unten Sinus-
lumen (mit angeschnittenen Lymphozyten). Ein Fortsatz der Sinus-
endothelzelle mit drei großen tuschehaltigen Zytosomen diagonal
nach rechts oben, Oberer und unterer Bildrand Myelozyten ange-
schnitten.

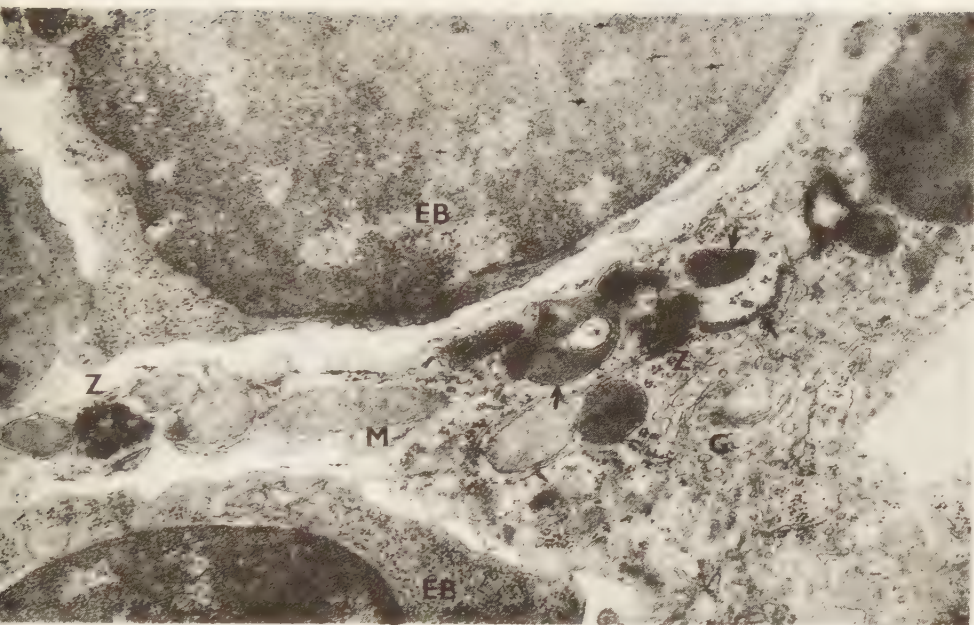


Abb. 8: 37 800 x vergr. 60 Minuten nach Tuscheinjektion. Oben und unten am Bildrand zwei Erythroblasten angeschnitten. Bildmitte und rechts phagozytierende Retikulumzelle mit zwei tuschehaltigen Zytosomen und zahlreichen Überresten phagozytierter Erythrozyten (Pfeile); ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, z.T. Ribosomenbesetzt; Golgi-Apparat; Mitochondrien.

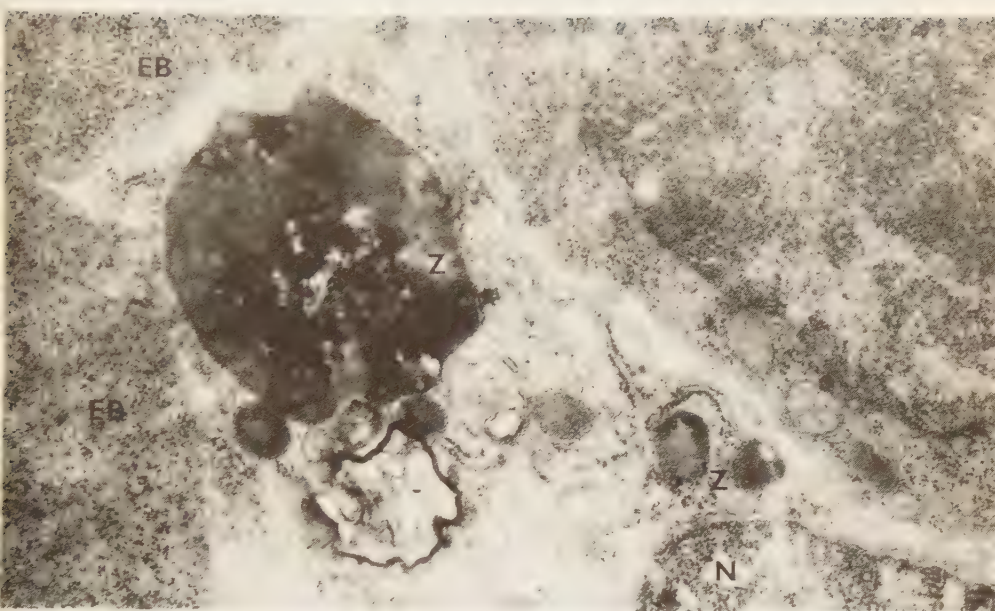
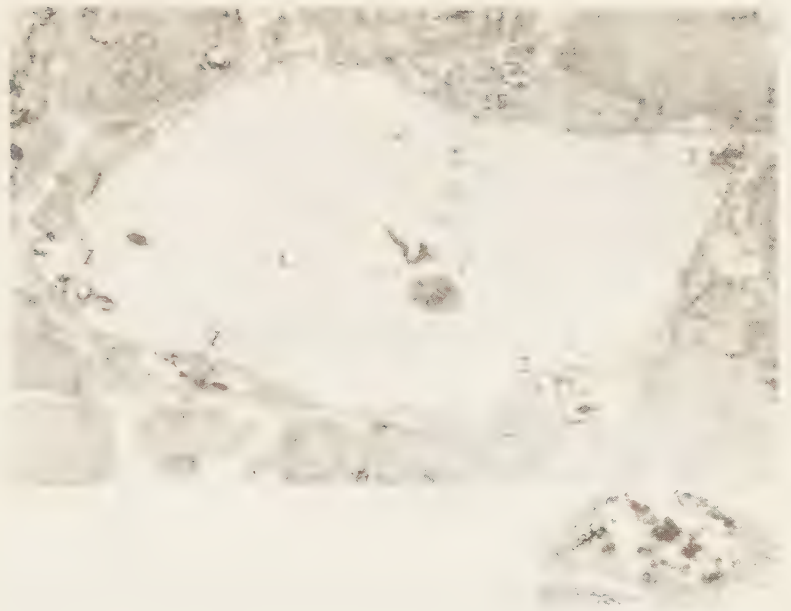
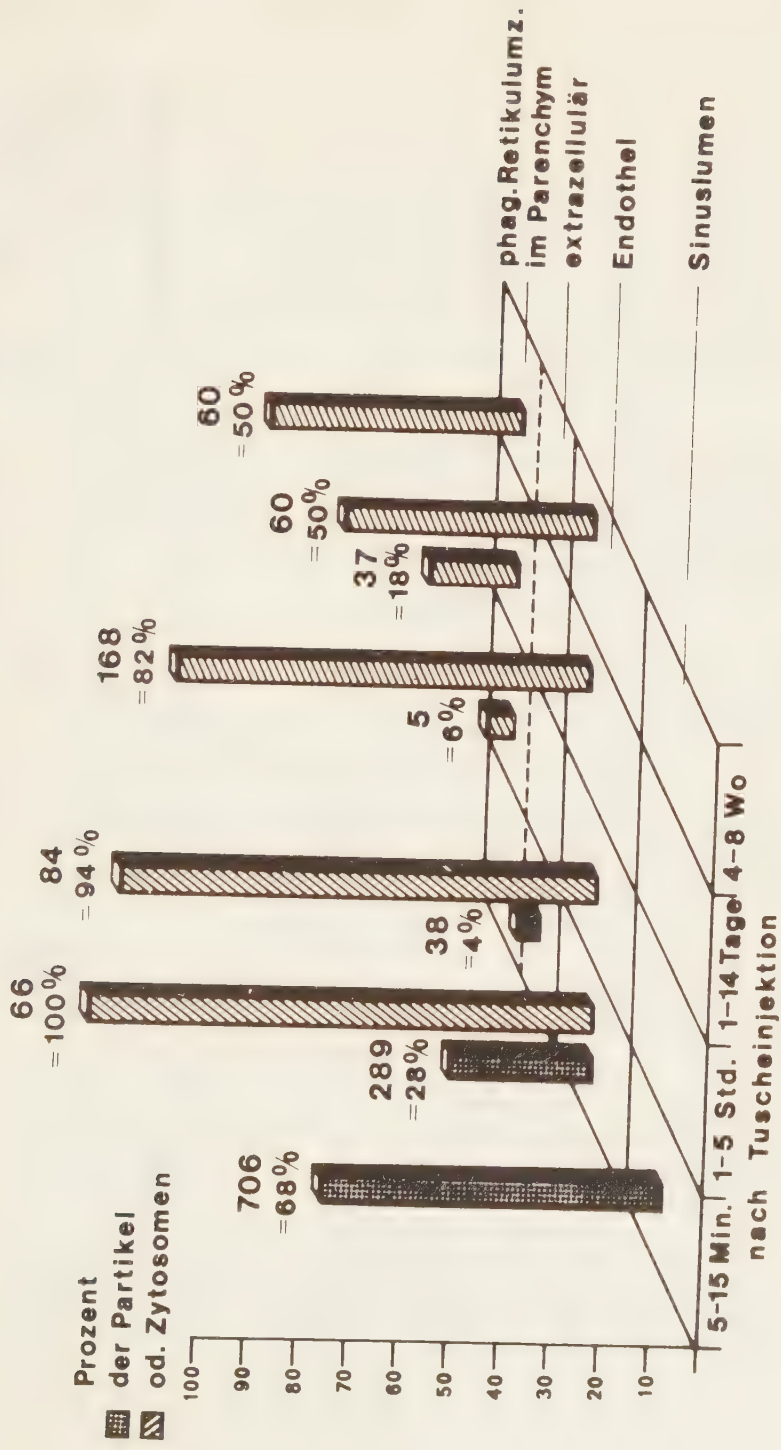


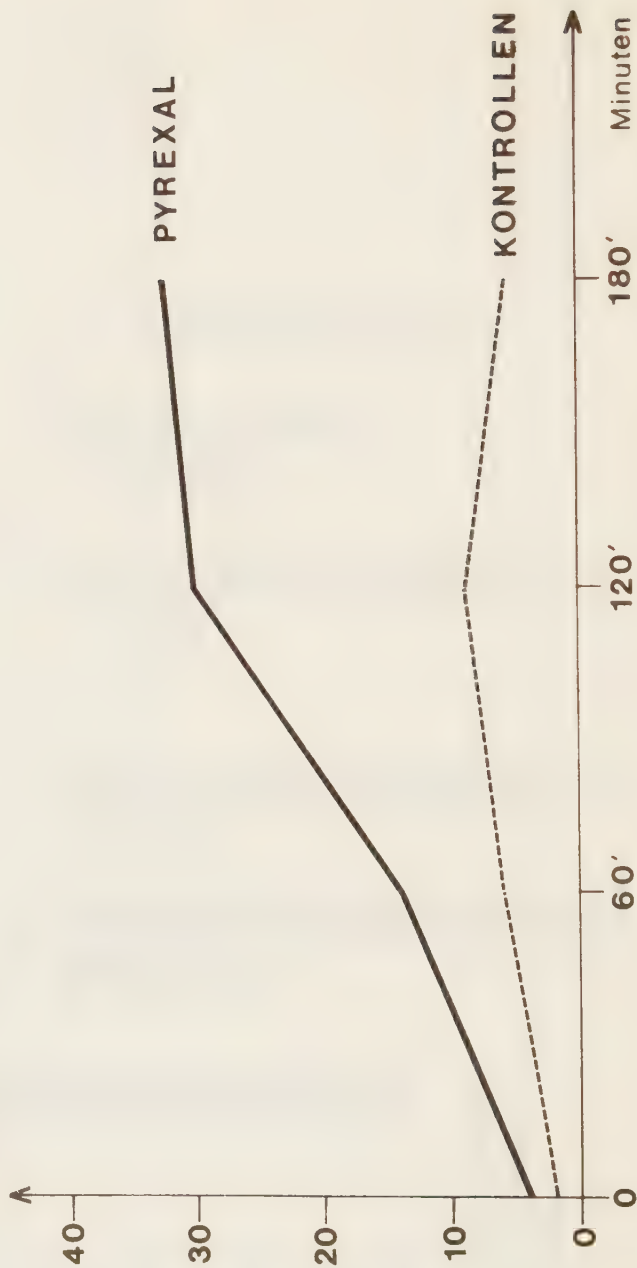
Abb. 9: 42 000 x vergr. 14 Tage nach Tuscheinjektion. Links oben und unten Erythroblasten angeschnitten. Mitte und rechts (rechts Kern angeschnitten) phagozytierende Retikulumzelle mit zahlreichen Zytosomen, von denen das größte (links) innerhalb eines feingranulären, elektronendichten Materials Kohlepartikel enthält.



- Abb. 10: 11 700 x vergr. 8 Wochen nach Tuscheinjektion. Sinus, links Sinusendothelzelle mit Kern. 4 tuscehaltige vakuolige Zytosomen in den Fortsätzen der Sinusendothelzellen; die Zytosomen enthalten neben den Tuschepartikeln kein feingranuläres Material.
- Abb. 10a: 29 000 x vergr. 8 Wochen nach Tuscheinjektion. Tuscehaltiges Zytosom in Sinusendothelzelle, Ausschnitte aus Abb. 10 (Pfeil).
- Abb. 11: Dreidimensionale Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Tuscephagozytose im Knochenmark: Die Höhe der Säulen gibt die Prozentzahlen von Tuschepartikeln (Tuscekonglomeraten) sowie tuscehaltigen Zytosomen während vier bestimmter Zeiträume nach Tuscheinjektion (5-15 Minuten, 1-5 Stunden, 1-14 Tage, 4-8 Wochen) an. In der 3. Dimension aufgetragen sind 4 verschiedene Orte der Tusceablagerung im Knochenmark (Sinuslumen - Endothel - extrazellulär im Parenchym - intrazellulär im Parenchym). 100% also: Gesamtzahl ausgezählter Partikel oder Zytosomen bei allen z. B. 5-15 Minuten nach Tuscheinjektion getöteten Tieren; die tatsächlichen Prozentzahlen (Höhe der Säulen); Verteilung dieser Tuschteilchen innerhalb des Knochenmarks. (Nähere Erläuterung im Text.)
- Abb. 12: Mittelwerte der Granulozyten pro mm^3 peripheres Blut zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Pyrexalinjektion (——) oder Kochsalzinjektion (-----).



Granulozyten-Mittelwerte
(in Tausend)



nach Pyrexal-, bzw. NaCl Injektion

LITERATUR

- 1) Alksne J. F., The passage of colloidal particles across the dermal capillary wall under the influence of histamine.
Quart. J. Exper. Physiol 44, 51 (1959)
- 2) De Baker S. B. C. u. a. Tissue Changes following Injection of Iron-Dextran Complex.
J. Path. Bact. 82, 453 (1961)
- 3) Benacerraf, B., Quantitative Studies of the Granulopoetic Activity of the Reticulo-Endothelial System. III
B. N. Halpern, The Effect of Cortisone and Nitrogen Mustard
G. Biozzi, S. A. Benos on the Regenerative Capacity of the R. E. S. after Saturation with Carbon.
Brit. J. Exp. Path. 35, 97 (1954)
- , G. Biozzi, Phagozytosis of heat-denatured human serum albumin labelled with J 131 and its use as a means of investigating liver blood flow.
B. N. Halpern, Brit. Exp. Path. 33, 35 (1957)
C. Stiffel, D. Monton
- , E. Kivy-Rosenberg, The Effect of High Doses of X-Irradiation on the Phagocytic, Proliferative, and Metabolic Properties of the Reticulo-Endothelial System.
M. M. Sebestgen, J. Exptl. Med. 110, 49 (1959)
B. Zweifach
- 4) Bergmann H., Der Einfluß bakterieller Pyrogene auf die Phagozytoseaktivität der Granulocyten und auf die elektrische Oberflächenladung menschlicher Blutzellen.
G. Buschmann, Klin. Wschr. 32, 500 (1954)
P. Döring,
E. Fritze, F. Wendt
- 5) G. Biozzi, Quantitative Study of the Granulopoetic Activity of the R. E. S. A Study of the kinetics of granulopoetic activity of the R. E. S. in relation to the dose injected.
B. Benacerraf, Brit. Exp. Path. 34, 441 (1953)
B. N. Halpern.
- 6) R. S. Cotram, A Light and E. M. Analysis of Vascular Injury.
G. Majno Ann. NY. Acad. Sci. 116, 750 (3, 1964)

- 7) Erhart, H.,
Th. Fischer Knochenmarksfunktionsprüfungen bei Patienten mit bösartigen Geschwülsten.
Klin. Wschr. 40, 670-677 (13, 1962)
- 8) M. G. Farquar,
S. L. Wissig,
G. E. Palade Glomerular Permeability: I Ferritin Transfer across the normal Capillary Wall.
J. Exper. Med. 113, 47 (1961)
- 9) Filkins J. P., R. E. Chase,
J. J. Smith Characteristics of a Plasma Factor Governing Carbon Phagocytosis in the Isolated Perfused Rat Liver.
J. Reticuloendothel Soc. 2, 278, (4, 1965)
- 10) Frick, G., H. Konrad Sofortreaktionen im peripheren Blutbild nach Glukokortikoiden, Adrenalin, ACTH und Pyrogenen.
Fol. Hämat. 81, 4, 377-405 (1964)
- 11) Fridrich, R., M. Schäfer Die Funktion des retikuloendothelialen Systems nach lokaler Strahlenbelastung der Leber.
Strahlentherapie 128, 549 (1965)
- 12) Hampton, J. C. An E. M. Study of the Hepatic Uptake and Excretion of Submicroscopic Particles injected into the Blood Stream and into the Bile Duct. .
Acta. anat. 32, 262 (1958)
- 13) Heilmeyer I. Knochenmarksfunktionstest mit Pyrexal
Dtsch. med. Wschr. 75, 644 (1957)
- 14) Huhn, D. Die Feinstruktur des Knochenmarks der Ratte bei Anwendung neuerer Aldehydfixationen.
Blut 13 (5, 1966) 291
- 15) Kampschmidt R. F. Further Studies on Carbon Clearance after Endotoxin in the Rat.
J. Reticuloendothel. Soc. 2, 256 (1965)
- 16) Kaye G. J., G. D. Pappas Studies on the Cornea, I, II
J. Cell Biol. 12, 475, 481 (1962 a u. b)

- 17, Yeens W.P., J.H. Iandl Studies of the Reticuloendothelial Mass and Sequestering Function of the Rat Bone Marrow. *Blood* 26, 157 (2, 1965)
- 18, Furchinsky G.,
H. Lillmann Lehrbuch der Pharmakologie, 2. Auflage S. 287, 306,
G. Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
- 19, Marino G., G.E. Palade Studies on Inflammation. I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An E. M. Study. *J. E. B. C.* 11 (1961) 571
- , ---, G. J. Schoeff Studies on Inflammation. II. The Site of Action of Histamine and Serotonin along the Vascular Tree: A topographic Study. *J. E. B. C.* 11, 607 (1961)
- 20, Mergisian R. Effect of Chlorambucil on the Blood Clearance of injected Particulate Matter, *J. Reticuloend. Society* 2, 238 (1965)
- 21, Meizer H. Der Aktivitätswechsel der alkalischen Neutrophilenphosphatase im Pyrexal-Reizversuch und die Bedeutung dieses Tests für die Klinik einiger Blutkrankheiten. *Folia Haemat. N. F.* 6, 53 (1961)
- 22, Morat H.J.,
N. V. P. Fernando Acute inflammation. The earliest fine structural changes at the blood-tissue barrier. *Laboratory Investigation* Vol. 12 No. 9 (895-910) Sept. 1963 International Academy of Path. Printed in USA.
- 23, Muir A.R., L. Goldberg The Tissue Response to Iron Dextran. An E. M. Study. *J. Path. Bact.* 82, 471 (1961)
- 24, Norman S. J.,
Earl P. Benditt Function of the Reticuloendothelial System. I. A. Study on the Phenomenon of Carbon Clearance Inhibition. II. Participation of a Serum Factor in Carbon

- Clearance.
J. of Exptl. Med. 122, 693-719 (1965, 4a+b).
- 25) Palade, G. E. Transport in Quanta across the Endothelium of Blood Capillaries. Anat. Record 136, 254 (1960)
---, Blood Capillaries of the Heart and other Organs.
Circulation XXIV, 368 (1961)
- 26) Pease D. C. An E. M. Study of Red Bone Marrow; Blood XI No. 6, 501 (1956)
- 27) Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. C. B. 17, 208 (1963)
- 28) Rowley D. A. Mast Cell Damage and Vascular Injury in the Rat. An E. M. Study of a Reaction Produced by Thorotrast.
Brit. J. exptl. Path. 44, 284 (1963)
- 29) Spurlock B. O.,
V. C. Kattine,
J. A. Freeman Technical Modification in Maraglas-Embedding.
J. Cell. Biol. 17, 203 (1963)
- 30) Stodtmeister R.,
T. M. Fliedner Die akute Stress-Situation des Knochenmarks, Med. Klinik 52, 2225-2227 (1957)
---, Sandkühler St., Fliedner Über die Beziehung des Ausschwemmungsmechanismus zur Sinusfunktion im Knochenmark
Schweiz. Med. Wschr. Nr. 39/40, 1225 (1957)
- 31) Tormey J. McD. Artfactual Localisation of Ferritin in the Ciliary Epithelium in Vitro.
J. Cell. Biol. 25, 1 (2, 1965)
- 32) Weinreich J.,
J. Bussmann, D. Mappes Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Milz und Knochenmark bei Ratten mit Hilfe einer Knochenmarks-

- funktionsprüfung.
Zschr. f. ges. exptl. Med. 133, 221-243 (1960)
- 33) Weiss L., The structure of Bone Marrow. Functional Interrelationsip of Vascular and Hemopoetic Compartments in Experimental Hemolytic Anemia. An E. M. Study. J. of Morphology 117 467 (1965)
- 34) Wiener J., An electron Microscopic Study of Leukocyte Emigration and Vascular Permeability in Tuberkulin Sensitivity.
R. G. Lattes, D. Spiro Am. J. Path. 50 No. 3, 485 (1967)
- 35) Zamboni L., D. Pease The Vascular Bed of Red Bone Marrow
J. Ultrastruct Res. 5, 65-85 (1961)

L e b e n s l a u f

Am 22. Juni 1940 wurde ich, Christoph Steidle, als sechstes Kind des Arztes Robert Steidle und seiner Frau Mathilde, geborene Schwarzmaier, in München geboren.

1946 wurde ich in der Volksschule in Feldkirchen bei Westerham eingeschult. Nach 5 Volksschuljahren verließ ich die Schule und trat in München in die 1. Klasse des Maximilian-Gymnasiums ein, von wo ich nach der 3. Klasse in das Alte Realgymnasium überwechselte.

Dort absolvierte ich die restlichen 6 Schuljahre und schloß im Sommer 1961 mit der Reifeprüfung ab.

Im August 1961 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Ich schließe mein Studium im Juni dieses Jahres mit Beendigung des Staatsexamens ab.

1964 famulierte ich einen Monat im Städtischen Krankenhaus Bad Aibling bei Chefarzt Dr. Köstler, 1966 zwei Monate im Schwabinger Krankenhaus, München bei Prof. Dr. Begemann.

Meine Doktorarbeit machte ich im Hämatologischen Institut bei Prof. W. Stich über das Thema:

"Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Tuschephagozytose und Wirkung pyrogener Reizstoffe am Knochenmark."

